

SEPARATION OF NUCLEIC ACID CONTAINING MISMATCHED PORTION AND REAGENT THEREFOR

Publication number: JP10257900

Publication date: 1998-09-29

Inventor: ARAKAWA MIGAKU; KAMIMURA HIDEKI; KAWAKAMI FUMIKIYO; KAWAMURA YOSHIHISA; KURAMITSU SHIGENORI

Applicant: TOYO BOSEKI

Classification:

- International: G01N33/53; C07H21/02; C07H21/04; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/566; G01N33/53; C07H21/00; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/566; (IPC1-7): C12Q1/68; C07H21/02; C07H21/04; C12N15/09; G01N33/53; G01N33/566

- european:

Application number: JP19960337026 19961217

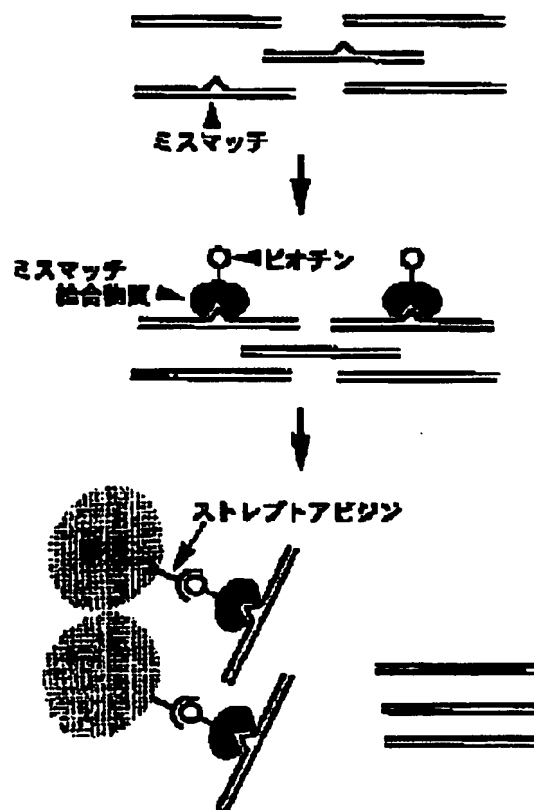
Priority number(s): JP19960337026 19961217

Report a data error here

Abstract of JP10257900

PROBLEM TO BE SOLVED: To separate a nucleic acid having a mismatched portion by bringing a substance capable of binding to the mismatched portion of the two-strand nucleic acid bound to a catchable substance into contact with a two-strand nucleic acid group and subsequently binding the catchable substance bound to the bound two-strand nucleic acid to a solid phase substance.

SOLUTION: This method for separating a nucleic acid having a mismatched portion comprises bringing a substance (e.g. a Mut S protein originating from *Thermus thermophilus*) capable of specifically binding to the mismatched portion of a two-strand nucleic acid bound to a catchable substance such as biotin, avidin, digoxigenin or digoxigenin-resistant antibody into contact with a two-strand nucleic acid group comprising two-strand DNAs, two-strand RNAs or DNA/RNA hybrids to bind the substance capable of specifically binding to the mismatched portion of the two-strand nucleic acid to a mismatched portion-containing two-strand nucleic acid among the two-strand nucleic acid group, and subsequently binding the catchable substance of the bound nucleic acid with a solid phase substance, such as avidin, biotin or a Mut S-resistant antibody capable of catching the substance, thereby enabling to separate the nucleic acid containing the mismatched portion from the two-strand nucleic acid group.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-257900

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月29日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68 A
C 0 7 H 21/02		C 0 7 H 21/02
		21/04 B
C 1 2 N 15/09	Z N A	G 0 1 N 33/53 M
G 0 1 N 33/53		U

審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-337026

(22) 出願日 平成8年(1996)12月17日

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 荒川 琢

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 上村 秀喜

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 川上 文清

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミスマッチを含む核酸を分離する方法およびそのための試薬

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 2本鎖DNA集団中に含まれるミスマッチを含む2本鎖DNAを分離する方法及び該方法に使用する試薬の提供。

【解決手段】 2本鎖核酸集団に、捕捉可能な物質、例えばビオチンを結合した2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質、例えばサーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)由来のMut S蛋白質を接触させ、ミスマッチを含む2本鎖核酸と結合させ、該結合した物質を、捕捉可能な物質と結合し得る物質、例えばストربتアビジンを結合した固相担体と反応させ、該核酸集団からミスマッチを含む核酸を分離することを特徴とするミスマッチを含む核酸を分離する方法及びそのための試薬。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 2本鎖核酸集団(A)に、捕捉可能な物質(B)を結合した2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質(C)を接触させ、該2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質(C)と2本鎖核酸集団(A)中のミスマッチを含む2本鎖核酸(D)を結合させ、該結合した物質(E)の捕捉可能な物質(B)を、該物質(B)を捕捉しうる固相化した物質(F)と結合させ、2本鎖核酸集団(A)からミスマッチを含む核酸(D)を分離することを特徴とするミスマッチを含む核酸を分離する方法。

【請求項2】 2本鎖核酸集団(A)が、2本鎖DNA、2本鎖RNAまたはDNA/RNAハイブリッドである請求項1記載の方法。

【請求項3】 捕捉可能な物質(B)がビオチン、アビジン、ジゴキシゲニンまたは抗ジゴキシゲニン抗体である請求項1記載の方法。

【請求項4】 捕捉可能な物質(B)を捕捉しうる固相化した物質(F)が、固相に結合したアビジン、ビオチン、抗ジゴキシゲニン抗体、ジゴキシゲニンまたは抗Mu t S抗体である請求項1記載の方法。

【請求項5】 固相が有機高分子材料、無機高分子材料または磁性化された、これらの物質である請求項4記載の方法。

【請求項6】 2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質(C)が、高度好熱菌由来のDNA修復に関与する蛋白質、大腸菌由来のDNA修復に関与する蛋白質、枯草菌由来のDNA修復に関与する蛋白質またはヒト由来のDNA修復に関与する蛋白質である請求項1記載の方法。

【請求項7】 2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質(C)が、高度好熱菌由来のDNA修復に関与する蛋白質である請求項1記載の方法。

【請求項8】 2本鎖DNAのミスマッチに特異的に結合する物質(C)が、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)由来のMu t S蛋白質である請求項1記載の方法。

【請求項9】 2本鎖DNA集団に、ビオチンが結合した2本鎖DNAのミスマッチに特異的に結合する物質を接触させ、該物質と2本鎖DNA集団中のミスマッチを含む2本鎖DNAを結合させ、該結合した物質のビオチンを固相化したアビジン類と結合させ、該2本鎖DNA集団からミスマッチを含むDNAを分離することを特徴とするミスマッチを含むDNAを分離する方法。

【請求項10】 核酸増幅反応の任意のサイクル終了後に得られる2本鎖DNA集団に、ビオチン化した高度好熱菌由来のMu t S蛋白質を接触させて、該蛋白質とミスマッチを含む2本鎖DNAを結合させ、次いで、DNA増幅反応の任意のサイクルにおけるプライマーと鋳型のアニーリングまたはプライマーの伸長反応またはその

両方を行い、それらの終了後、結合した前記物質のビオチンを固相化したアビジン類と結合させ、該2本鎖DNA集団からミスマッチを含むDNAを分離することを特徴とするミスマッチを含むDNAを分離する方法。

【請求項11】 核酸増幅反応が、PCR、NASB A、鎖置換増幅および3SRよりなる群から選択される反応である請求項10記載の方法。

【請求項12】 捕捉可能な物質(B)を結合した2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質(C)および該捕捉可能な物質(B)を捕捉しうる固相化した物質(F)を含むことを特徴とするミスマッチを含む核酸を分離するための試薬。

【請求項13】 捕捉可能な物質(B)がビオチン、アビジン、ジゴキシゲニンまたは抗ジゴキシゲニン抗体である請求項12記載の試薬。

【請求項14】 捕捉可能な物質(B)を捕捉しうる固相化した物質(F)が、固相に結合したアビジン、ビオチン、抗ジゴキシゲニン抗体、ジゴキシゲニンまたは抗Mu t S抗体である請求項12記載の試薬。

【請求項15】 固相が有機高分子材料、無機高分子材料または磁性化された、これらの物質である請求項12記載の試薬。

【請求項16】 2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質(C)が、高度好熱菌由来のDNA修復に関与する蛋白質、大腸菌由来のDNA修復に関与する蛋白質、枯草菌由来のDNA修復に関与する蛋白質またはヒト由来のDNA修復に関与する蛋白質である請求項12記載の試薬。

【請求項17】 2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質(C)が、高度好熱菌由来のDNA修復に関与する蛋白質である請求項12記載の試薬。

【請求項18】 2本鎖DNAのミスマッチに特異的に結合する物質(C)が、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)由来のMu t S蛋白質である請求項12記載の試薬。

【請求項19】 ビオチン化した2本鎖DNAのミスマッチに特異的に結合する物質および固相化したアビジン類を含むことを特徴とするミスマッチを含むDNAを分離するための試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は2本鎖核酸、特に2本鎖DNA集団中に含まれるミスマッチを含む2本鎖DNAを分離する方法および該方法に使用する試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】DNAポリメラーゼが鋳型鎖相補的にDNAを合成していく際に、ある頻度で複製の誤りを起こすことが知られている。これらは、間違ったヌクレオチドを取り込む挿入(ミスインコーポレーション)、欠

失、付加からなる。DNA増幅反応によく用いられる *p* o l Iファミリーに属するDNAポリメラーゼにおける、これらの複製の誤りの頻度がMathurらによって測定されたことが開示される(Gene 108, 1-6, 1991)。これによれば、Taq DNAポリメラーゼを用いて約100,000塩基対を合成する度に、1.4~2.5回の割合で複製の誤りが起こることが示されている。また、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性(ブルーフリーディング活性)をもつDNAポリメラーゼ、例えば、Pfu DNAポリメラーゼでは、これよりも頻度が低く、約1,000,000塩基対を合成する度に、1.2~2.0回の割合で複製の誤りが起こるとされている。

【0003】これらのDNAポリメラーゼを用いて、DNA増幅反応を行った場合、複製の誤りが起こった断片を鋳型として、さらに増幅が進むため、得られた増幅産物には鋳型とは異なる配列を持つ断片が多量存在することになる。従って、これらのDNAポリメラーゼを用いて増幅反応を行い、得られた遺伝子断片を取得し解析しようとする場合、その信頼性が常に問題となっていた。

【0004】Wagnerらはグルコカイネースのエクソン3領域の増幅反応を行い、得られたDNA断片を変性し、再結合して、鋳型とは異なる配列をもつ断片にミスマッチを形成させ、固相化した大腸菌由来のミスマッチDNA結合蛋白質、Mut Sを用いて、それを分離する方法を提案した(WO 95/12689)。しかしながら、この方法では大腸菌由来のMut Sを固相支持担体に結合させるという煩雑な工程を必要とする。また、固相上でミスマッチDNA結合反応を行うため、少量のサンプルを用いる場合、反応液の回収効率が悪く不向きである。さらに大腸菌由来のMut Sは非常に不安定であり、DNA増幅反応中の温度では使えないうえに保存が難しいという問題点を抱えていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】そこで、2本鎖核酸、特にDNAの集団からミスマッチを持つ核酸断片を分離する簡便な方法の開発が望まれていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは種々鋭意検討した結果、捕捉可能な物質、例えばビオチンと結合した2本鎖DNAのミスマッチに特異的に結合する物質を用いることによって、2本鎖DNA集団からミスマッチ配列を含む断片を簡便に分離できる方法を構築した。さらに、2本鎖DNAのミスマッチに特異的に結合する物質として、高度好熱菌由来の2本鎖DNAのミスマッチに特異的に結合するMut S蛋白質を用いることによって、高温のDNA増幅反応液中で2本鎖DNA集団からミスマッチ配列を含むDNA断片を簡便に分離できる方法を見出し本発明に到達した。

【0007】すなわち本発明は2本鎖核酸集団(A)に、捕捉可能な物質(B)を結合した2本鎖核酸のミス

マッチに特異的に結合する物質(C)を接触させ、該2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質(C)と2本鎖核酸集団(A)中のミスマッチを含む2本鎖核酸(D)を結合させ、該結合した物質(E)の捕捉可能な物質(B)を、該物質(B)を捕捉しうる固相化した物質(F)と結合させ、該核酸集団(A)からミスマッチを含む核酸(D)を分離することを特徴とするミスマッチを含む核酸を分離する方法である。

【0008】また、本発明は捕捉可能な物質(B)を結合した2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質(C)および該物質(B)を捕捉しうる固相化した物質(F)を含むことを特徴とするミスマッチを含むDNAを分離するための試薬キットである。

【0009】

【発明の実施態様】本発明において、2本鎖核酸集団(A)とは2本鎖DNA、2本鎖RNAまたはDNA/RNAハイブリッドなどがあり、ミスマッチ配列を含む核酸断片を含む。本発明において、ミスマッチ配列を含む核酸(D)とはG-C、A-T以外の塩基対が含まれるもの、あるいは5塩基対以内の相補鎖をもたない部分(ループ構造)が含まれるものをいう。

【0010】本発明において、捕捉可能な物質(B)としては、例えばビオチン、アビジン、ジゴキシゲニンまたは抗ジゴキシゲニン抗体などが挙げられる。また、該捕捉可能な物質(B)を捕捉しうる物質(F)としては、ビオチンではアビジン、アビジンではビオチン、ジゴキシゲニンでは抗ジゴキシゲニン抗体、抗ジゴキシゲニン抗体ではジゴキシゲニンまたはMut Sでは抗Mut S抗体が挙げられる。アビジンとしてはストレプトアビジンなども使用できる。該捕捉しうる物質(F)は担体に結合されて固相化されている。

【0011】本発明において使用する担体としては、水不溶性有機高分子材料、例えば多孔質シリカ、多孔質ガラス、珪藻土、セライトなどの珪素含有物質、ニトロセルロース、ヒドロキシアパタイト、アガロース、デキストラン、セルロース、カルボキシメチルセルロースなどの多糖類の架橋体やメチル化アルブミン、ゼラチン、コラーゲン、カゼインなどのタンパク質の架橋体などが例示される。また、ポリスチレン、ポリ(メタ)アクリレート、ポリビニルアルコール、ポリアクリロニトリルまたはこれらの共重合体なども例示される。また、水不溶性無機高分子材料、例えば酸化アルミニウム、酸化チタンなどがある。固相としては、その形状は粒子、膜、フィルターなどがある。固相としては粒子が特に好ましく、その表面は多孔質または非多孔質であってもよい。粒子の平均的な粒径は、遠心分離などの簡便な操作で粒子を回収するために、0.01μm以上、好ましくは0.05μm以上である。一方、粒子の単位沈降体積当たりの表面積を大きくし、かつハイブリッド形成に適当な条件下で固相が均一に分散する状態を保つことによ

て、高いハイブリッド形成効率を達成するためには、20 μm 以下、好ましくは10 μm 以下である。磁性化された固相としては、磁性酸化鉄のビーズ、磁性酸化鉄の微粉砕粒子を表面に有する単分散、超常磁性粒子（特公平4-501959）、重合性シラン被膜によって覆われた超常磁性酸化鉄を有する磁気応答粒子（特公平7-6986）、有機ポリマー中に封入された微粉末状の磁化可能な粒子などが例示される。磁性化された固相は、固体および液体の分離を磁力を利用して簡単に行うことができる。

【0012】本発明において使用する2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質（C）とは、ミスマッチを含む核酸、特にDNAを認識し、かつ結合する蛋白質であり、ミスマッチ結合蛋白質（Mut S蛋白質）と称する。このMut S蛋白質としては、*E. coli*ミスマッチ修復系の成分などが確認されている。また、サルモネラ・チフムリウム（*Salmonella typhimurim*）のMut S、ストレプトコッカス・ニューモニア（*Streptococcus pneumoniae*）のhexAなどを含む他の微生物由来のものも知られている。さらに、高度好熱菌、例えばサーマス・サーモフィラス（*Thermus thermophilus*）由来のMut S蛋白質がある。該蛋白質は、本発明者らによってクローニングされ、大量発現に成功しており、その性質が解析され、60℃においてもミスマッチDNA結合能が保持されており、熱安定性に優れる（*Nucleic Acids Research* 24, 640-647 (1996)）。

【0013】高度好熱菌、サーマス・サーモフィラス（*Thermus thermophilus*）由来のMut S蛋白質が熱安定性に優れることは、以下の点で大きな効果をもたらす。すなわち、従来より使用されていた大腸菌由来のMut S蛋白質は、特に不安定で-80℃で保存しなければならない。また、上記のミスマッチを含むDNAを分離するために、固相化あるいはバイオチン化する場合などは回収率が悪いことが予想される。これに対し、高度好熱菌、サーマス・サーモフィラス（*Thermus thermophilus*）由来のMut S蛋白質は4℃で6ヶ月以上安定で、かつ固相化あるいはバイオチン化する場合などでも回収率が良い。

【0014】さらには、高度好熱菌、サーマス・サーモフィラス（*Thermus thermophilus*）由来のMut S蛋白質は60℃でもミスマッチDNA結合能が保持されているため、増幅反応中の高温下でも作用させることが可能となる。DNA増幅反応の任意のサイクルにおけるプライマーと鋳型のアニーリング、またはプライマーの伸長反応、またはその両方の反応を行い、それらの反応終了後、捕捉可能な物質、例えばバイオチンを固相化した、捕捉可能な物質と結合し得る物質、例えばストレプトアビジンと結合させ、増幅中のDNA集団からミスマッチを含むDNAを分離することができる。

【0015】精製されたMut S蛋白質はミスマッチ結合対の塩基を含むDNAと結合するが、ミスマッチを有しないDNAまたは1本鎖DNAとは結合しない。この

Mut S-DNAの相互作用は、DNAの分解（degradation）や変性（modification）を生じえない。

【0016】本発明ではミスマッチを含むDNA断片の分離をさらに簡便に行うために、Mut S蛋白質を捕捉可能な物質、例えばバイオチンと結合する。これにより液相中でミスマッチを含む核酸を該Mut S蛋白質と結合した後、結合した物質のバイオチンを固相化されたストレプトアビジンと結合させ、ミスマッチを含む核酸を液相から分離することができる。

【0017】Mut S蛋白質と捕捉可能な物質、例えばバイオチンとの結合は、以下のように簡単に行うことができる。例えばバイオチンアミドカブロエート-N-ヒドロキシサルフォスクシニミドエステル（BAC-SulfoNHS）を用いて、室温でMut S蛋白質と30分間反応するだけで、容易にバイオチン結合Mut S蛋白質を合成することができる。Mut S蛋白質1分子あたりのバイオチン分子の結合数は、好ましくは1から3分子である。これは反応時のMut S蛋白質とBAC-SulfoNHSのモル比を1:8から1:16にすることで合成される。Mut S蛋白質1分子あたりのバイオチン分子の結合数が5分子を超えると、Mut S蛋白質の結合能が阻害されるので好ましくない。

【0018】このようにあらかじめ、捕捉可能な物質、例えばバイオチンと結合されたMut S蛋白質を用いることにより、比較的少量の溶液（100 μl 以下）でミスマッチを含むDNAとの結合反応を行い、固相化された捕捉可能な物質と結合し得る物質、例えばアビジンと捕捉可能な物質、例えばバイオチンを結合させることにより、ミスマッチを含むDNAを液相中から除くことができる。固相化された、捕捉可能な物質と結合し得る物質（F）、例えば固相化されたアビジンは、例えば磁気ビーズに結合されたアビジンである。この場合は磁石を接近させてビーズを集合させ、液相のみを効率よく回収できる。また、固相化されたストレプトアビジンは、例えばビーズに結合されたストレプトアビジンがある。この場合は遠心分離によりビーズを集合させて、液相のみを効率よく回収できる。回収された反応液はそのまま次の反応に供することができる。

【0019】本発明において回収された反応液はそのまま、次の増幅サイクルに供することができる。上記分離操作はアニーリング、伸長反応、2本鎖分離の各サイクル毎に行っても良いし、ある間隔を置いたサイクル毎に行っても良い。また、任意のサイクルのあとに1回行っても良い。このように増幅サイクルの途中でミスマッチを含むDNAを分離すると、これが鋳型となって増幅することを防止することができ、従って、本来の鋳型とは異なる配列を含むがミスマッチを含まない断片の生成を抑制することができる。

【0020】ミスマッチ配列を含むDNA断片を分離されるべき2本鎖DNA集団（A）はどのような由来のもの

10

20

30

40

50

のであってもよいが、例えばDNA増幅反応の任意のサイクル終了後に得られる集団、または、DNA増幅反応の任意のサイクル終了後に変性し、再結合を行った集団が含まれる。ある増幅サイクルの伸長反応で複製の誤りが起こると、その後、それが鋳型として使用されるために、本来の鋳型とは異なる配列を含むがミスマッチを含まない断片が生じる。この断片を一旦変性し、他の本来の鋳型と同じ配列を持つ断片と再結合させることにより、任意のサイクルで複製の誤りが起こった部位にミスマッチ配列を形成させることができる(図2参照)。

【0021】このようにして得られた核酸集団に対し、本発明の方法でミスマッチ配列を含む核酸断片を分離することにより、本来の鋳型とは異なる配列を含む断片を除去することができる。上記分離操作は増幅の各サイクル毎に行っても良いし、ある間隔を置いたサイクル毎に行っても良い。また、任意のサイクルのあとに1回行っても良い。このように増幅サイクルの途中でミスマッチを含むDNAを分離すると、これが鋳型となって増幅することを防止することができ、従って、本来の鋳型とは異なる配列を含むがミスマッチを含まない断片の生成を抑制することができる。DNA増幅反応はPCR、NASBA、鎖置換増幅、3SRなどが含まれる。

【0022】PCRとは、下記工程を含む核酸配列の増幅方法である。

工程A. 必要により標的核酸を熱変性して、1本鎖核酸とする：

工程B. 該1本鎖核酸と標的核酸に相補的な塩基配列を有する正方向および逆方向プライマーおよび4種のdNTPを熱安定性DNAポリメラーゼを含む緩衝溶液中で反応させて、1本鎖核酸に上記プライマーをアニールさせ、プライマー伸長反応を行う：

工程C. プライマー伸長物を部売りして、1本鎖とする：

工程D. 上記工程B. および工程C. を繰り返す。

【0023】NASBAおよび3SRとは、下記工程を含む核酸配列の増幅方法である。

工程A. 標的核酸を必要により変性処理した1本鎖の第1鋳型に、第1鋳型の核酸配列(RNA)に対して十分に相補的な配列およびその5'末端側にプロモーター配列を有する第1プライマーをハイブリダイズさせ、RNA依存DNAポリメラーゼにより伸長させて、第1鋳型RNAに相補的な第2鋳型である第1プライマー伸長物(DNA)を得る：

工程B. 第1鋳型DNAから第2鋳型DNAを分離して、1本鎖の第2鋳型核酸(DNA)を得る：

工程C. 1本鎖の第2鋳型DNAに、第2鋳型の核酸配列(DNA)に相補的な核酸配列(DNA)を有する第2プライマーをハイブリダイズさせ、DNA依存DNAポリメラーゼにより伸長し、第2鋳型DNAに相補的な第2プライマー伸長物(DNA)を得、このようにして

標的核酸配列に上流にプロモーター配列を有する2本鎖DNA中間体を生成させ：

工程D. 前記プロモーター配列を認識することができるDNA依存RNAポリメラーゼを用いて、前記2本鎖DNA中間体から前記標的核酸の多数のRNAコピーを増加させ：

工程E. 必要により、前記RNAコピーを用いて、下記工程1~4を必要な回数繰り返す。

【0024】NASBAは工程B. においてRNase Hを使用し、3SRは熱変性により第1鋳型DNAから第2鋳型DNAを分離する。

【0025】鎖置換増幅とは、下記工程を含む核酸配列の増幅方法である。

工程A. 少なくとも1つが置換された過剰量のデオキシヌクレオシド3リン酸、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠くDNAポリメラーゼ、標的配列の1本鎖に相補的で、5'末端にエンドヌクレアーゼのための認識配列を有する複数のプライマー、および前記認識配列からなる2本鎖の一方の鎖が置換塩基対を含む場合にいずれか一方の鎖を切断できるエンドヌクレアーゼからなる反応混合物を標的核酸配列に添加し：

工程B. 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物と1本鎖断片を反応させる。

【0026】本発明の具体的な実施態様としては、2本鎖DNA集団にビオチン化したミスマッチ結合物質(高度好熱菌由来のDNA修復に関与する蛋白質)を接触させ、ミスマッチ配列を含む2本鎖DNAと結合させ、該結合した物質を固相化したストレプトアビジンと結合させ、該DNA集団からミスマッチ配列を含む2本鎖DNAを分離することよりなる方法がある(図1参照)。

【0027】さらに具体的な実施態様としては、2本鎖DNA集団に、ビオチン化したサーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)由来のMutS蛋白質を接触させ、ミスマッチ配列を含む2本鎖DNA断片と結合させ、該結合した物質を固相化したストレプトアビジンと結合させ、該DNA集団からミスマッチ配列を含むDNAを分離する方法がある。

【0028】本発明の別な実施態様としては、DNA増幅反応の任意のサイクル終了後に得られる2本鎖DNA集団に、ビオチン化した2本鎖DNAのミスマッチ配列に特異的に結合する物質を接触させ、ミスマッチ配列を含む2本鎖DNAと結合させ、該結合した物質を固相化したストレプトアビジンと結合させ、該DNA集団からミスマッチ配列を含むDNAを分離する方法がある。

【0029】本発明のさらに別な実施態様としては、DNA増幅反応の任意のサイクル終了後に変性し、再結合して得られる2本鎖DNA集団に、ビオチン化した2本鎖DNAのミスマッチに特異的に結合する物質を接触させ、ミスマッチ配列を含む2本鎖DNAと結合させ、該結合した物質を固相化したストレプトアビジンと結合さ

せ、該DNA集団からミスマッチを含むDNAを分離する方法もある。

【0030】本発明としては、DNA増幅反応の任意のサイクル終了後に得られる2本鎖DNA集団とビオチン化した高度好熱菌由来のMutS蛋白質を接触させる工程を、DNA増幅反応の任意のサイクルにおけるプライマーと鋳型のアニーリングまたはプライマーの伸長反応またはその両方の反応で行い、それらの反応終了後、該物質を固相化したストレプトアビジンと結合させ、該DNA集団からミスマッチ配列を含むDNA断片を分離する方法もある。

【0031】本発明は、捕捉可能な物質(B)を結合した2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質

(C)および該捕捉可能な物質(B)を捕捉しうる固相化した物質(F)を含むことを特徴とするミスマッチを含むDNA断片を分離するための試薬であり、その一実施態様としてはビオチン化した2本鎖DNAのミスマッチに特異的に結合する物質および固相化したアビジン類を含む。2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質1分子あたりに結合された捕捉可能な物質(B)の分子数は、1~10、好ましくは1~2である。捕捉可能な物質(B)を結合した2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質(C)を含む試薬は、他に蒸留水、バッファーを含む。また、該捕捉可能な物質(B)を捕捉しうる固相化した物質(F)は、捕捉可能な物質(B)を結合した2本鎖核酸のミスマッチに特異的に結合する物質(C)を含む試薬と別個な試薬とすることが好ましい。該捕捉可能な物質(B)を捕捉しうる固相化した物質(F)は捕捉可能な物質(B)より多いことが好ましい。

【0032】

【実施例】次に本発明を実施例を用いて説明する。

実施例1 サーマス・サーモフィラス(Thermus thermophilus)

PCR反応液の調製

制限酵素EcoRIで消化されたpMOL21	1ng
増幅プライマーP1(配列番号1)	10pmoles
増幅プライマーP2(配列番号2)	10pmoles
Pfu用10×バッファー(Stratagene製)	5μl
Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene製)	2.5単位
2mM dNTPs	5μl
全量	50μl

反応温度条件	94℃、30秒
	55℃、30秒
	72℃、3分

サイクル数 25回

【0035】得られた反応液に、以下の物質を添加し ※ ※た。

5mg/ml グリコーゲン(ペーリンガーマンハイム)	5μl
5M 酢酸アンモニウム	50μl
イソプロパノール	100μl

【0036】室温で上記反応液を10分間放置した後、50 15000rpmで10分間遠心分離し、DNA沈殿を回収

* hilus)HB8株由来のMutS蛋白質のビオチン化反応
サーマス・サーモフィラス(Thermus thermophilus)HB8株由来のMutS蛋白質(以下、TthMutSと記す)の調製は、高松らによって開示された方法(Nucleic Acids Research, 24 640-647, 1996)に従った。ビオチン化反応はイムノブローブTMビオチニレーションキット(シグマ社製)を使用した。精製されたTthMutS 250μgとビオチンアミドカブロエートN-ヒドロキシサルフォスクシニミドエステル(BAC-SulfoNHS)10μgとを0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5) 100ml中で室温で30分間反応した。反応液を10mMリン酸ナトリウム液で緩衝化したセファクリルG-25カラム(1cmφ×5cm)にかけ、未反応のBAC-SulfoNHSとTthMutSを分離した。TthMutS 1分子あたりに結合されたビオチン分子の数を、上記キットに添付された試薬を用いて、アビジン-HABAアッセイによって測定した。その結果、TthMutS 1分子あたり2.5個のビオチン分子が結合されていた。

【0033】**実施例2** pMOL21のPCRによる増幅

プラスミド、pMOL21(奈良先端大学 真木教授より入手)はその分子中にアンピシリン耐性遺伝子及びrpsL遺伝子を有する。rpsL遺伝子の産物は大腸菌細胞内12SrRNAに結合することにより、その細胞をストレプトマイシン感受性とする。従って、この遺伝子に変異が生じ産物が機能しなくなったとき、その細胞はストレプトマイシン耐性となる。DNA増幅産物中に含まれる複製の誤りの有無を評価するため、このプラスミドをPCRにより増幅し、自己環状化した後、このプラスミドをもって大腸菌を形質転換し、ストレプトマイシンを含む培地または含まない培地にて形成されたコロニー数の比をもって、その変異率を算出した。

【0034】以下に、PCRの条件を記す。

11

した。75%エタノール50 μ lで洗浄し、乾燥した後、蒸留水45 μ lに溶解した。これに10 \times Hバッファ（東洋紡）5 μ l、EcoRI（東洋紡）10単位を加え、37 $^{\circ}$ Cで16時間反応した。反応終了後、フェノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、50 μ lのTEバッファに溶解して、pMOL21増幅産物を得た。

*

反応液

pMOL21増幅産物	31 μ l
20%PEG20000	5 μ l
10 \times Hバッファ（東洋紡）	4 μ l

上記反応液を94 $^{\circ}$ C、2分加熱した後、約2 $^{\circ}$ C毎分で37 $^{\circ}$ Cまで冷却した。

*

蒸留水	12 μ l
変性再結合したDNA	4 μ l
10 \times TthMutSバッファ	2 μ l
(500mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、5mM MgCl ₂ 、7mM2メルカプトエタノール)	

ビオチン化TthMutS

2 μ l

【0039】上記反応液を60 $^{\circ}$ C、30分保温したのち、あらかじめ1 \times TthMutS バッファ50 μ lで3回洗浄したストレプトアビジン磁気ビーズ（ダイナル）0.5mgを懸濁した。室温で5分間放置したのち、磁気スタンドでビーズを寄せ、上清を回収した。回収した反応液のうち2 μ lをとり、ライゲーションハイ（東洋紡）2 μ lと混合し、室温で2時間反応した後、大腸菌MF101のコンピテントセル200 μ lに加えた。氷上で30分間放置した後、42 $^{\circ}$ Cで30秒間保温し、直後に氷上に戻した後、SOC培地800 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間保温した。このうち、100 μ lをアンピシリン100 μ g/mlを含むLB培地プレート上で、他の900 μ lをアンピシリン100 μ g/mlおよびストレプトマイシン200 μ g/mlを含むLB培地ブ★

20★レート上で20時間培養した。アンピシリンを含む培地で形成されたコロニー数（Ca）、アンピシリン及びストレプトマイシンを含む培地で形成されたコロニー数（Cb）をそれぞれ計数し、下記式により変異率（m.f.）を算出した。

$$m.f. = Cb * 100 / (Ca * 9)$$

【0040】図3に示されるように、TthMutSを加えていない試料に比して、TthMutSを加えた試料は有意に変異率が低下し、従って、変性および再結合により複製の誤りが起こった部分にミスマッチを形成させたDNAが分離されたことを示す。

【0041】実施例4 DNA増幅反応中のビオチン化TthMutSによるミスマッチを含むDNA断片の分離

PCR反応液の調製

制限酵素EcoRIで消化されたpMOL21	1ng
(pMOL21は奈良先端大 真木教授より入手)	
増幅プライマーP1	10pmoles
増幅プライマーP2	10pmoles
Pfu用10 \times バッファ（Stratagene製）	5 μ l
Pfu DNA ポリメラーゼ（Stratagene製）	2.5単位
2mMdNTPs	5 μ l
全量	50 μ l

反応温度条件 94 $^{\circ}$ C、30秒
55 $^{\circ}$ C、30秒
72 $^{\circ}$ C、3分

【0042】反応サイクル5回目のアニーリング開始時（55 $^{\circ}$ C、30秒開始時）にビオチン化TthMutS 1 μ g、または10回目のアニーリング開始時（55 $^{\circ}$ C、30秒開始時）にビオチン化TthMutS 2 μ gを反応液に添加した。それぞれ伸長反応終了時（72 $^{\circ}$ C、3分終了

50時にあらかじめ1 \times TthMutS バッファ50 μ lで3回洗浄したストレプトアビジン磁気ビーズ（ダイナル）0.2mg（反応サイクル5回目の場合）または0.4mg（反応サイクル10回目の場合）を懸濁した。室温で5分間放置したのち、磁気スタンドでビーズを寄せ、

上清を回収した。回収した反応液は引き続いて増幅反応に供した。

5 mg/ml グリコーゲン (ベーリンガー・マンハイム) 5 μ l
5 M 酢酸アンモニウム 50 μ l
イソプロパノール 100 μ l

室温で10分間放置した後、15000 rpmで10分間遠心分離し、DNA沈殿を回収した。75%エタノール50 μ lで洗浄し、乾燥した後、蒸留水45 μ lに溶解した。これに10×Hバッファー (東洋紡) 5 μ l、EcoRI (東洋紡) 10単位を加え、37℃で16時間反応した。反応終了後、フェノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、50 μ lのTEバッファーに溶解した。このうち、2 μ lをとり、ライゲーションハイ (東洋紡) 2 μ lと混合し、室温で2時間反応した後、大腸菌MF101のコンピテントセル200 μ lに加えた。氷上で30分間放置した後、42℃で30秒間保温し、直後に氷上に戻した後、SOC培地800 μ lを加え、37℃で1時間保温した。このうち、100 μ lをアンピシリン100 μ g/mlを含むLB培地プレート上で、他の900 μ lをアンピシリン100 μ g/mlおよびストレプトマイシン200 μ g/mlを含むLB培地プレート上で20時間培養した。アンピシリンを含む培地で形成されたコロニー数 (Ca)、アンピシリンおよびストレプトマイシンを含む培地で形成されたコロニー数 (Cb) をそれぞれ計数し、下記式により変異率 (m. f.) を算出した。

$$m. f. = Cb * 100 / (Ca * 9)$$

【0044】図4に示されるように、TthMutSを加えていない試料に比して、TthMutSを加えた試料は有意に変異率が低下し、従って、DNA増幅反応中に複製の誤りが起こった部分のミスマッチを含むDNAが分離されたことを示す。

【0045】

【発明の効果】本発明は2本鎖核酸、特にDNA集団に捕捉可能な物質、例えばビオチンと結合した2本鎖DNAのミスマッチ配列に特異的に結合する物質を接触させ、ミスマッチ配列を含む2本鎖DNAと結合させた後、該物質を固相化したストレプトアビジンと結合させ、該DNA集団から簡便に分離することができる。

【0046】また、熱安定性に優れる高度好熱菌、サーマス・サーモフィラス (*Thermus thermophilus*) 由来のMutS蛋白質を用いることで、固相化あるいはビオチン化する場合でも回収率が良くなり、かつ、その長期保存安定性も改善される。さらには、増幅反応中の高温下でもMutS蛋白質を作用させることが可能となり、DNA増幅反応の任意のサイクルにおけるプライマーと鋳型のアニーリング、またはプライマーの伸長反応、またはその両方の反応で行い、それらの反応終了後、ビオチンを固相化したストレプトアビジンと結合させ、増幅中のDNA集団からミスマッチを含むDNAを分離することも

* 【0043】25回サイクルが終了した反応液について、以下の物質を添加した。

5 μ l
50 μ l
100 μ l

可能となる。

【0047】従来から、大腸菌由来のMutS蛋白質を固相化してミスマッチを含むDNA断片を分離する方法が知られている (WO 95/12689, Wagner R. Nucleic Acids Research 23, 3944-3948 (1995)) が、この方法では該蛋白質を固相支持担体に結合せねばならず、非常に煩雑な工程を要し、またこれら支持担体に結合したMutS蛋白質を用いるため、例えばDNA増幅反応液中で、そのまま用いるには不向きであった。しかしながら、本発明ではMutS蛋白質に捕捉可能な物質を結合し、該物質を捕捉しうる固相化した物質を用いて、固相にMutS蛋白質に結合したミスマッチ配列を有する核酸を液相から容易に分離することが可能となる。

【0048】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

GGGGAATTCA GTTTGTAGAA ACGCAAAAAG 30

【0049】配列番号1: 2

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

GGGGAATTCT TGAACACGAA AGGCCCTC 28

【図面の簡単な説明】

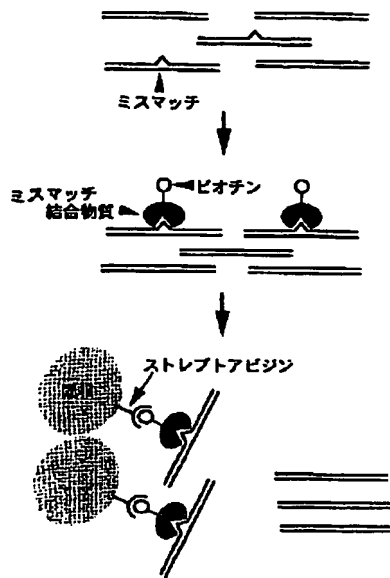
【図1】本発明のミスマッチを含む核酸を分離する過程を示す図である。

【図2】DNA増幅反応により得られたミスマッチを有する2本鎖核酸を変性し、増幅前の鋳型と同じ配列をもつ断片を再結合して、ミスマッチを有する2本鎖核酸を得る過程を示す図である。

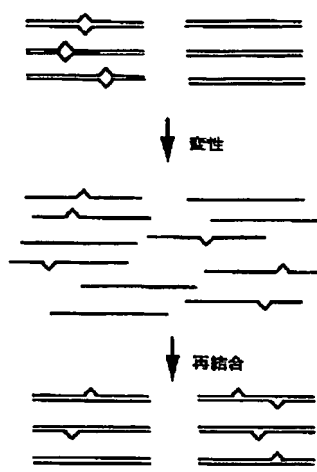
【図3】pMOL21増幅産物を変性し、再結合させ、複製の誤りが起こった部分にミスマッチを形成させたDNA集団からビオチン化TthMutSによりミスマッチを含むDNA断片の分離する前後でのrpsL遺伝子の変異率を比較した図である。

【図4】pMOL21増幅反応中にビオチン化TthMutSによりミスマッチを含むDNA断片を分離した増幅産物のrpsL遺伝子の変異率を比較した図である。

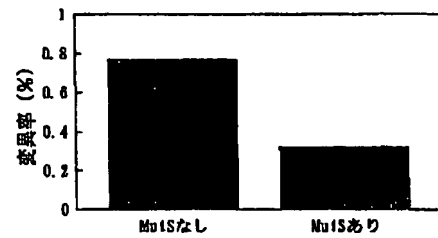
【図1】



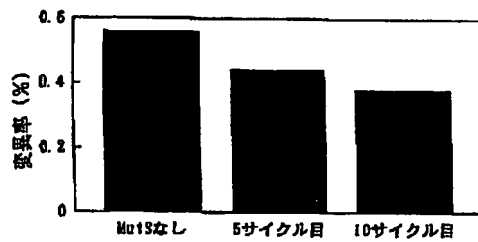
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁸

G 0 1 N 33/53

33/566

識別記号

F I

G 0 1 N 33/566

C 1 2 N 15/00

Z N A A

(72)発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 倉光 成紀

大阪府豊中市宮山町2丁目16番41号